HVJ Envelope VECTOR KIT

GenomONE® シリーズ

GenomONE® | GenomONE®-Neo | GenomONE®-Duo

取 扱 説 明 書 (第 4 版)

１．概要 2

1-1：トランスフェクション原理 2
1-2：製品仕様 2

2．本書記載の方法について 3

2-1：使用量の定義（AU：Assay Unit） 3
2-2：ウェルプレートサイズ別推奨細胞数 3
2-2-1：接着細胞 3
2-2-2：浮遊細胞 3

3．接着細胞へのトランスフェクション 4

3-1：プラスミド DNA の導入 4
3-1-1：推奨プロトコル 4
3-1-2：DNA 濃度が低い場合のプロトコル 5
3-2：siRNA の導入 6
3-3：アンチセンスオリゴ／デコイオリゴ（ODN）の導入 7
3-4：タンパク質の導入 8
3-5：トラブルシューティング 9

４．浮遊細胞へのトランスフェクション 10

4-1：プラスミド DNA の導入 10
4-1-1：推奨プロトコル 10
4-1-2：DNA 濃度が低い場合のプロトコル 11
4-2：siRNA の導入 12
4-3：アンチセンスオリゴ／デコイオリゴ（ODN）の導入 13
4-4：タンパク質の導入 14
4-5：トラブルシューティング 15

5．動物個体へのトランスフェクション（*in vivo*） 16

5-1：プラスミド DNA、siRNA の導入 16
5-2：アンチセンスオリゴ／デコイオリゴ（ODN）、タンパク質の導入 17

6．多種類・多検体の迅速なトランスフェクション 18

6-1：プラスミド DNA の導入 18
6-2：siRNA の導入 19

使用上の注意 20

この取扱説明書（以下「本書」と表記）では、GenomONE®シリーズを用いて各種遺伝子やタンパク質などをトランスフェクションする際の標準的な方法を記載しています。ここに記載された方法である程度の導入効率を得ることが可能ですが、細胞種ごとに最適となる条件は異なりますので、注意事項等に記載のある項目について、適宜条件の最適化を行っていただくことをお勧めいたします。

1．概要

1-1：トランスフェクション原理

HVJ Envelope（以下 HVJ-E）内に、トランスフェクションしたい分子（DNA、タンパク質、アンチセンスオリゴヌクレオチド、siRNA など）を封入して HVJ-E ベクターとし、融合タンパク質の膜融合活性を利用して標的細胞および組織に分子を導入します。

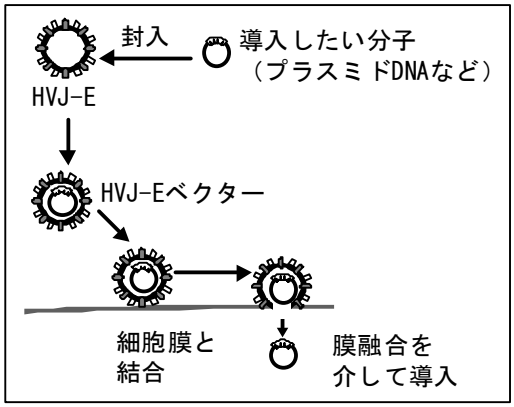

図1：HVJ-Eによるトランスフェクション

1-2：製品仕様

試薬	製品コード	内容および容量					
		冷凍（-80℃）保存		冷蔵（2～8℃）保存			
		HVJ-E 0.25mL/本	HVJ-E（N） 0.25mL/本	試薬 A 0.5mL/本	試薬 B 0.3mL/本	試薬 C 1.0mL/本	緩衝液 6.5mL/本
GenomONE	GE001	1	---	1	1	1	1
	GE004	4	---	1	1	1	1
	GE016	16	---	4	4	4	4
	GE040	40	---	10	10	10	10
GenomONE-Neo	GN001	---	1	1	1	1	1
	GN004	---	4	1	1	1	1
	GN016	---	16	4	4	4	4
	GN040	---	40	10	10	10	10
GenomONE-Duo	GD002	1	1	1	1	1	1

【補助試薬の役割】

- 試薬 A：HVJ-E と導入したい分子との親和性を高め、HVJ-E 内への封入を促進します。
- 試薬 B：HVJ-E の膜の透過性を高めます。
- 試薬 C：分子を封入した HVJ-E（HVJ-E ベクター）と細胞（または組織）との親和性を高め、導入効率を向上させます。

【使用回数】

製品コード	HVJ-E の本数	使用回数	
		Plasmid DNA, ODN, protein	siRNA (oligo-type)
GE001 / GN001	1	6 assays (wells)	25-50 assays (wells)
GE004 / GN004	4	25 assays (wells)	100-200 assays (wells)
GE016 / GN016	16	100 assays (wells)	400-800 assays (wells)
GE040 / GN040	40	250 assays (wells)	1000-2000 assays (wells)

使用回数は、6-well プレート使用時の回数で表記しています。

【保存安定性】

- 品質保証期限は HVJ-E の内袋に記載されています。融解した HVJ-E は再凍結を行わずに冷蔵で保存し、2 週間以内を目安にお使いください。

【品質】

- HVJ-E は、ウイルスを原料としていますが、その増殖性、感染性を完全に不活化した精製品です。
- 無菌試験でバクテリア、カビ類の混入がないことを確認しています。
- 血清存在下、培養細胞への遺伝子導入発現を確認しています。

2．本書記載の方法について

本書では、接着細胞、浮遊細胞および動物個体へのトランスフェクションを行う標準的な方法を記載しています。また、多検体の迅速処理に対応したプロトコルを記載しました。

トランスフェクションしたい分子と導入対象により、様々な方法があります。本書では、導入対象（接着細胞、浮遊細胞、動物個体）と導入する分子ごとに手順を封入ステップ、導入ステップに分けて記載していますが、導入する分子の濃度や種類に応じて封入のステップに違いがあります。

2-1：使用量の定義（AU：Assay Unit）

HVJ-E 量として記載の AU（Assay Unit)は、6-well プレートを使用してプラスミド DNA のトランスフェクションを行う場合の標準使用量（40μL）を 1AU として定義しています。

2-2：ウェルプレートサイズ別推奨細胞数

プロトコルでは、6-well プレート使用時を標準として条件を記載しています。異なるサイズのウェルプレートを使用する場合の細胞数は以下のとおりです。

2-2-1：接着細胞

プレート	細胞数（ウェルプレート播種時*）
6-well プレート	$0.4\sim2.0\times10^5$ cells/2.0mL of medium/well
24-well プレート	$1.0\sim5.0\times10^4$ cells/0.5mL of medium/well
96-well プレート	$0.25\sim1.25\times10^4$ cells/0.125mL of medium/well

*トランスフェクション時は 1day culture、50～80%confluent の条件で使用

2-2-2：浮遊細胞

浮遊細胞へのトランスフェクション時には、細胞と HVJ-E ベクターをチューブで混合し、遠心をかけることで両者を接触させて導入します。

プレート	細胞数		
	遠心導入時（チューブ中）	再懸濁培地	ウェルプレート播種時
6-well	$0.4\sim2.0\times10^6$ cells/0.5mL of medium/tube	2.0mL	$0.4\sim2.0\times10^6$ cells/2.0mL of medium/well
24-well	$0.2\sim1.0\times10^6$ cells/0.25mL of medium/tube	1.0mL	$1.0\sim5.0\times10^5$ cells/0.5mL of medium/well
96-well			$0.25\sim1.25\times10^5$ cells/0.125mL of medium/well

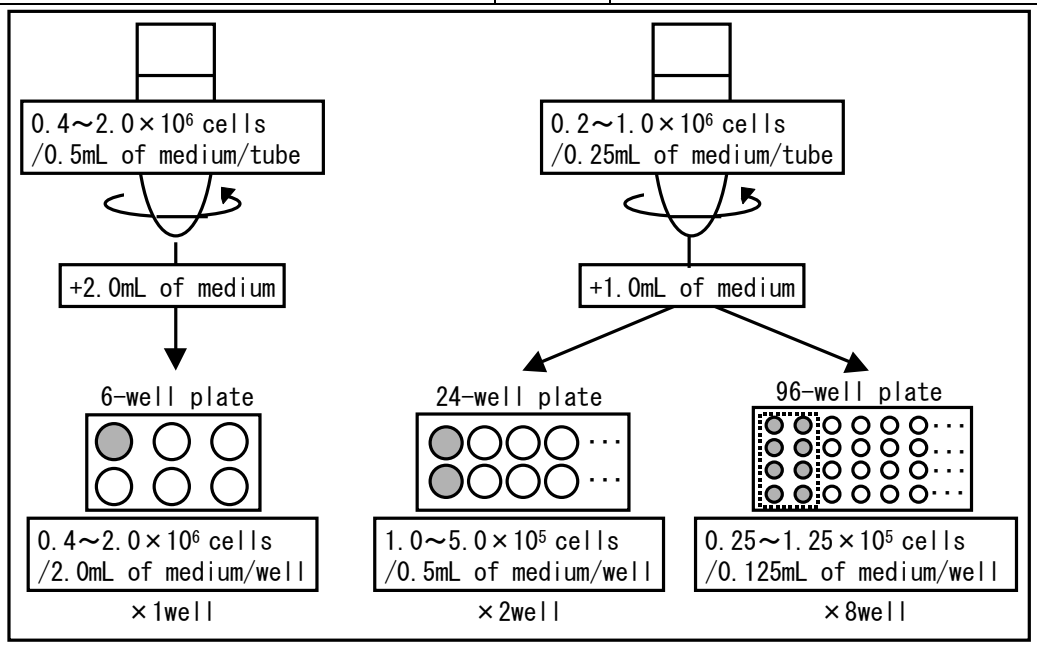

図 2：浮遊細胞へのトランスフェクションの考え方

3．接着細胞へのトランスフェクション

3-1：プラスミド DNA の導入

3-1-1：推奨プロトコル

以下は 6-well プレート使用時を例に記載したものです。他のサイズのプレートを使用する場合の細胞数は p3 を参照してください。

■ 推奨 DNA/TE 溶液濃度：2～4μg/μL
■ 細胞数：0.4～2.0×10^5 cells/2.0mL of medium/well of 6-well plate
■ プロトコル（第 2 法）

		手順	試薬量
封入ステップ	①	HVJ-E を融解し、マイクロテストチューブに採取[1]	HVJ-E：1AU（40μL）
	②	10000g（10000～12000rpm）・4℃で 5 分間遠心し、上清除去	
	③	DNA/TE 溶液に懸濁（ピペッティング 20～30 回）	DNA/TE 溶液：10～20μL
	④	試薬 B を添加・混合[2]（タッピング）	試薬 B：1～2μL
	⑤	10000g（10000～12000rpm）・4℃で 5 分間遠心し、上清除去	
導入ステップ	⑥	沈殿を緩衝液に懸濁（ピペッティング 20～30 回）[3]	緩衝液：30μL
	⑦	試薬 C を添加・混合[4]（タッピング）	試薬C：5μL
	⑧	HVJ-E ベクター懸濁液を well 中の細胞培養液に添加し、37℃・5%CO_2 下で細胞に処理（必要に応じて培地交換）[5]	懸濁液（⑥＋⑦）：35μL
	⑨	37℃・5%CO_2 下で培養	

①～⑦の操作は氷上で行ってください。

■ プレートサイズ別試薬量

	封入ステップ			導入ステップ		
	HVJ-E ①	DNA/TE 溶液 ③	試薬 B ④	緩衝液 ⑥	試薬 C ⑦	処理液量 ⑧
6-well	1AU(40μL)	20μL	2μL	30μL	5μL	35μL×1well
24-well	0.5AU(20μL)	10μL	1μL	15μL	2.5μL	8μL×2well
96-well	0.5AU(20μL)	10μL	1μL	15μL	2.5μL	2μL×8well

[1] 34～37℃の恒温槽で速やかに融解し、氷が半分程度解けた時点で直ちに氷上に移してください。
[2] 試薬 B の添加量は、添加前の液量（③）の 1/10 量としてください。
[3] 緩衝液への懸濁は、泡立てないようほぼ均一な白濁状態となるまで行ってください。VORTEX による攪拌は気泡が発生しますので、ご面倒でもピペッティングによる懸濁を推奨いたします。
[4] 細胞の種類により、試薬 C の至適濃度は異なる場合があります。ご使用の細胞に応じて、適宜試薬 C 量の増減検討をお勧めします（2.5～25μL）。その際、最終液量が 35μL となるよう、⑥の緩衝液量を調整してください。
[5] 通常は HVJ-E ベクター懸濁液（⑥+⑦）を添加したままで除去する必要はありませんが、細胞毒性が見られる場合は、処理時間を 10 分間～3 時間程度として培地交換してください。

3-1-2：DNA 濃度が低い場合のプロトコル

推奨濃度以下の DNA/TE 溶液しか用意できない場合（0.5～2μg/μL）、試薬 A を用いて HVJ-E への DNA の封入を促進させます。以下は 6-well プレート使用時を例に記載したものです。他のサイズのプレートを使用する場合の細胞数は p3 を参照してください。

■ DNA/TE 溶液濃度：0.5～2μg/μL
■ 細胞数：0.4～2.0×10^5 cells/2.0mL of medium/well of 6-well plate
■ プロトコル（第 1 法）

		手順	試薬量
封入ステップ	①	HVJ-E を融解し、マイクロテストチューブに採取[6]	HVJ-E：1AU（40μL）
	②	試薬 A を添加・混合（タッピング）し、5 分間静置	試薬 A：10μL
	③	DNA/TE 溶液を添加・混合（タッピング）	DNA/TE 溶液：10μL
	④	試薬 B を添加・混合[7]（タッピング）	試薬 B：6μL
	⑤	10000g(10000～12000rpm)・4℃で 5 分間遠心し、上清除去	
導入ステップ	⑥	沈殿を緩衝液に懸濁（ピペッティング 20～30 回）[8]	緩衝液：30μL
	⑦	試薬 C を添加・混合[9]（タッピング）	試薬C：5μL
	⑧	HVJ-E ベクター懸濁液を well 中の細胞培養液に添加し、37℃・5%CO_2 下で細胞に処理（必要に応じて培地交換）[10]	懸濁液(⑥+⑦)：35μL
	⑨	37℃・5%CO_2 下で培養	

①～⑦の操作は氷上で行ってください。

■ プレートサイズ別試薬量

	封入ステップ				導入ステップ		
	HVJ-E ①	試薬 A ②	DNA/TE 溶液 ③	試薬 B ④	緩衝液 ⑥	試薬 C ⑦	処理液量 ⑧
6-well	1AU(40μL)	10μL	10μL	6μL	30μL	5μL	35μL×1well
24-well	0.5AU(20μL)	5μL	5μL	3μL	15μL	2.5μL	8μL×2well
96-well	0.5AU(20μL)	5μL	5μL	3μL	15μL	2.5μL	2μL×8well

[6] 34～37℃の恒温槽で速やかに融解し、氷が半分程度解けた時点で直ちに氷上に移してください。
[7] 試薬 B の添加量は、添加前の液量（①＋②＋③）の 1/10 量としてください。
[8] 緩衝液への懸濁は、泡立てないようほぼ均一な白濁状態となるまで行ってください。VORTEX による攪拌は気泡が発生しますので、ご面倒でもピペッティングによる懸濁を推奨いたします。試薬 A の特性により、遠心後の沈殿が強固になりやすく、緩衝液への懸濁を均一に行うのが難しい場合があります。その場合、さらに 20～30 回ピペッティングを行って十分に懸濁してください。
[9] 細胞の種類により、試薬 C の至適濃度は異なる場合があります。ご使用の細胞に応じて、適宜試薬 C 量の増減検討をお勧めします（2.5～25μL）。その際、最終液量が 35μL となるよう、⑥の緩衝液量を調整してください。
[10] 通常は HVJ-E ベクター懸濁液（⑥+⑦）を添加したままで除去する必要はありませんが、細胞毒性が見られる場合は、処理時間を 10 分間～3 時間程度として培地交換してください。

3-2：siRNA の導入

オリゴ型 siRNA は細胞質で効果を発現し、作用の特異性が高いことから低濃度での使用が可能です。また、HVJ-E の使用量もプラスミド DNA の場合の 1/4～1/8 量（0.25 AU～0.125 AU）に減らすことが可能です。以下は 6-well プレート使用時を例に記載したものです。他のサイズのプレートを使用する場合の細胞数は p3 を参照してください。

■ オリゴ型 siRNA 溶液濃度：0.1～0.5μg/μL
■ 細胞数：0.4～2.0×10^5 cells/2.0mL of medium/well of 6-well plate
■ プロトコル（siRNA 用）

		手順	試薬量
封入ステップ	①	HVJ-E を融解し、マイクロテストチューブに採取[11]	HVJ-E：0.25AU（10μL）
	②	siRNA 溶液を添加・混合（タッピング）	siRNA 溶液：10μL
	③	試薬 B を添加・混合[12]（タッピング）	試薬 B：2μL
	④	10000g（10000～12000rpm）・4℃で 5 分間遠心し、上清除去	
導入ステップ	⑤	沈殿を緩衝液に懸濁（ピペッティング 20～30 回）[13]	緩衝液：30μL
	⑥	試薬 C を添加・混合[14]（タッピング）	試薬C：5μL
	⑦	HVJ-E ベクター懸濁液を well 中の細胞培養液に添加し、37℃・5%CO_2 下で細胞に処理（必要に応じて培地交換）[15]	懸濁液（⑤＋⑥）：35μL
	⑧	37℃・5%CO_2 下で培養	

①～⑥の操作は、氷上で行ってください。

■ プレートサイズ別試薬量

	封入ステップ			導入ステップ		
	HVJ-E ①	siRNA 溶液 ②	試薬 B ③	緩衝液 ⑤	試薬 C ⑥	処理液量 ⑦
6-well	0.25AU(10μL)	10μL	2μL	30μL	5μL	35μL×1well
24-well	0.125AU(5μL)	5μL	1μL	15μL	2.5μL	8μL×2well
96-well	0.125AU(5μL)	5μL	1μL	15μL	2.5μL	2μL×8well

●ワンポイントアドバイス

使用する細胞種や標的遺伝子によって HVJ-E の至適量が異なる場合があります。導入効率、ノックダウン効率が低い場合は、ステップ①の HVJ-E 量を 1AU(40μL)～0.125AU(5μL)の範囲で検討し、条件の最適化を行ってください。その際、試薬 B の添加量は、添加前の液量（①＋②）の 1/10 量となるよう調整してください。

[11] 34～37℃の恒温槽で速やかに融解し、氷が半分程度解けた時点で直ちに氷上に移してください。
[12] 試薬 B の添加量は、添加前の液量（①＋②）の 1/10 量としてください。
[13] 緩衝液への懸濁は、泡立てないようほぼ均一な白濁状態となるまで行ってください。VORTEX による攪拌は気泡が発生しますので、ご面倒でもピペッティングによる懸濁を推奨いたします。
[14] 細胞の種類により、試薬 C の至適濃度は異なる場合があります。ご使用の細胞に応じて、適宜試薬 C 量の増減検討をお勧めします（2.5～25μL）。その際、最終液量が 35μL となるよう、⑤の緩衝液量を調整してください。
[15] 通常は HVJ-E ベクター懸濁液（⑤+⑥）を添加したままで除去する必要はありませんが、細胞毒性が見られる場合は、処理時間を 10 分間～3 時間程度として培地交換してください。

3-3：アンチセンスオリゴ／デコイオリゴ（ODN）の導入

以下は 6-well プレート使用時を例に記載したものです。他のサイズのプレートを使用する場合の細胞数は p3 を参照してください。

■ ODN 溶液濃度：0.5～2μg/μL
■ 細胞数：0.4～2.0×10^5 cells/2.0mL of medium/well of 6-well plate
■ プロトコル（第 1 法）

		手順	試薬量
封入ステップ	①	HVJ-E を融解し、マイクロテストチューブに採取[16]	HVJ-E：1AU（40μL）
	②	試薬 A を添加・混合（タッピング）し、5 分間静置	試薬 A：10μL
	③	ODN 溶液を添加・混合（タッピング）	ODN 溶液：10μL
	④	試薬 B を添加・混合[17]（タッピング）	試薬 B：6μL
	⑤	10000g(10000～12000rpm)・4℃で 5 分間遠心し、上清除去	
導入ステップ	⑥	沈殿を緩衝液に懸濁（ピペッティング 20～30 回）[18]	緩衝液：30μL
	⑦	試薬 C を添加・混合[19]（タッピング）	試薬C：5μL
	⑧	HVJ-E ベクター懸濁液を well 中の細胞培養液に添加し、37℃・5%CO_2 下で細胞に処理（必要に応じて培地交換）[20]	懸濁液（⑥＋⑦）：35μL
	⑨	37℃・5%CO_2 下で培養	

①～⑦の操作は氷上で行ってください。

■ プレートサイズ別試薬量

	封入ステップ				導入ステップ		
	HVJ-E ①	試薬 A ②	ODN 溶液 ③	試薬 B ④	緩衝液 ⑥	試薬 C ⑦	処理液量 ⑧
6-well	1AU(40μL)	10μL	10μL	6μL	30μL	5μL	35μL×1well
24-well	0.5AU(20μL)	5μL	5μL	3μL	15μL	2.5μL	8μL×2well
96-well	0.5AU(20μL)	5μL	5μL	3μL	15μL	2.5μL	2μL×8well

[16] 34～37℃の恒温槽で速やかに融解し、氷が半分程度解けた時点で直ちに氷上に移してください。
[17] 試薬 B の添加量は、添加前の液量（①＋②＋③）の 1/10 量としてください。
[18] 緩衝液への懸濁は、泡立てないようほぼ均一な白濁状態となるまで行ってください。VORTEX による攪拌は気泡が発生しますので、ご面倒でもピペッティングによる懸濁を推奨いたします。試薬 A の特性により、遠心後の沈殿が強固になりやすく、緩衝液への懸濁を均一に行うのが難しい場合があります。その場合、さらに 20～30 回ピペッティングを行って十分に懸濁してください。
[19] 細胞の種類により、試薬 C の至適濃度は異なる場合があります。ご使用の細胞に応じて、適宜試薬 C 量の増減検討をお勧めします（2.5～25μL）。その際、最終液量が 35μL となるよう、⑥の緩衝液量を調整してください。
[20] 通常は HVJ-E ベクター懸濁液（⑥+⑦）を添加したままで除去する必要はありませんが、細胞毒性が見られる場合は、処理時間を 10 分間～3 時間程度として培地交換してください。

3-4：タンパク質の導入

以下は 6-well プレート使用時を例に記載したものです。他のサイズのプレートを使用する場合の細胞数は p3 を参照してください。

■ タンパク質溶液濃度：0.5～2μg/μL
■ 細胞数：0.4～2.0×10^5 cells/2.0mL of medium/well of 6-well plate
■ プロトコル（第 1 法）

		手順	試薬量
封入ステップ	①	HVJ-E を融解し、マイクロテストチューブに採取[21]	HVJ-E：1AU（40μL）
	②	試薬 A を添加・混合し、5 分間静置	試薬 A：10μL
	③	タンパク質溶液を添加・混合（タッピング）	タンパク質溶液：10μL
	④	試薬 B を添加・混合[22]（タッピング）	試薬 B：6μL
	⑤	10000g(10000～12000rpm)・4℃で 5 分間遠心し、上清除去	
導入ステップ	⑥	沈殿を緩衝液に懸濁（ピペッティング 20～30 回）[23]	緩衝液：30μL
	⑦	試薬 C を添加・混合[24]（タッピング）	試薬C：5μL
	⑧	HVJ-E ベクター懸濁液を well 中の細胞培養液に添加し、37℃・5%CO_2 下で細胞に処理（必要に応じて培地交換）[25]	懸濁液（⑥＋⑦）：35μL
	⑨	37℃・5%CO_2 下で培養	

①～⑦の操作は氷上で行ってください。

■ プレートサイズ別試薬量

	封入ステップ				導入ステップ		
	HVJ-E ①	試薬 A ②	タンパク質溶液 ③	試薬 B ④	緩衝液 ⑥	試薬 C ⑦	処理液量 ⑧
6-well	1AU(40μL)	10μL	10μL	6μL	30μL	5μL	35μL×1well
24-well	0.5AU(20μL)	5μL	5μL	3μL	15μL	2.5μL	8μL×2well
96-well	0.5AU(20μL)	5μL	5μL	3μL	15μL	2.5μL	2μL×8well

●ワンポイントアドバイス
陽性電荷のタンパク質の場合、封入ステップ②の試薬 A の添加量を減らす（1/2～1/8）か、試薬 A を添加しない方法でお試しください。その場合、④の試薬 B の添加量は添加前の液量（①＋②＋③）の 1/10 量となるよう調整してください。

[21] 34～37℃の恒温槽で速やかに融解し、氷が半分程度解けた時点で直ちに氷上に移してください。
[22] 試薬 B の添加量は、添加前の液量（①＋②＋③）の 1/10 量としてください。
[23] 緩衝液への懸濁は、泡立てないようほぼ均一な白濁状態となるまで行ってください。VORTEX による攪拌は気泡が発生しますので、ご面倒でもピペッティングによる懸濁を推奨いたします。試薬 A の特性により、遠心後の沈殿が強固になりやすく、緩衝液への懸濁を均一に行うのが難しい場合があります。その場合、さらに 20～30 回ピペッティングを行って十分に懸濁してください。
[24] 細胞の種類により、試薬 C の至適濃度は異なる場合があります。ご使用の細胞に応じて、適宜試薬 C 量の増減検討をお勧めします（2.5～25μL）。その際、最終液量が 35μL となるよう、⑥の緩衝液量を調整してください。
[25] 通常は HVJ-E ベクター懸濁液（⑥+⑦）を添加したままで除去する必要はありませんが、細胞毒性が見られる場合は、処理時間を 10 分間～3 時間程度として培地交換してください。

3-5：トラブルシューティング

■ 導入効率が低い

以下の処理で効率を高めることが可能な場合があります。

- 試薬 C の添加量を標準の 2～4 倍にする。
- トランスフェクション時の培地量を減らし、HVJ-E ベクターおよび試薬 C の処理濃度を高める。
- HVJ-E ベクターを細胞に添加後、プレートのまま 35℃(細胞によっては 4℃～室温)、1500～3000rpm、10～60 分間の遠心を行う。

■ 細胞毒性が高い

細胞毒性が認められる場合は、以下の対応で毒性を軽減させることが可能な場合があります。

- HVJ-E ベクターを細胞に添加後 10 分～3 時間で洗浄し、培地交換する。
- HVJ-E の使用量または HVJ-E ベクターの培地への添加量を減らす。

４．浮遊細胞へのトランスフェクション

4-1：プラスミド DNA の導入

4-1-1：推奨プロトコル

浮遊細胞への導入時には、HVJ-E と細胞との接触効率を高めるため、細胞への処理時に遠心を加えます。以下は 6-well プレート使用時を例に記載したものです。他のサイズのプレートを使用する場合の細胞数は p3 を参照してください。

■ 推奨 DNA/TE 溶液濃度：2～4μg/μL
■ 細胞数（遠心導入時）：0.4～2.0×10^6 cells/0.5mL of medium/チューブ
■ プロトコル（第 2 法変法）

		手順	試薬量
封入ステップ	①	HVJ-E を融解し、マイクロテストチューブに採取[26]	HVJ-E：1AU（40μL）
	②	10000g（10000～12000rpm）・4℃で 5 分間遠心し、上清除去	
	③	DNA/TE 溶液に懸濁（ピペッティング 20～30 回）	DNA/TE 溶液：10～20μL
	④	試薬 B を添加・混合[27]（タッピング）	試薬 B：1～2μL
	⑤	10000g（10000～12000rpm）・4℃で 5 分間遠心し、上清除去	
導入ステップ	⑥	沈殿を緩衝液に懸濁（ピペッティング 20～30 回）[28]	緩衝液：30μL
	⑦	試薬 C を添加・混合[29]（タッピング）	試薬C：5μL
	⑧	HVJ-E ベクター懸濁液と培地に懸濁した細胞 0.5mL をチューブで混合	懸濁液（⑥＋⑦）：35μL 細胞：0.5mL
	⑨	2000～12000rpm、4℃～35℃で 10～30 分間遠心[30]	
	⑩	上清を除去し、培地 2.0mL に再懸濁後 6-well プレートに移し、37℃・5%CO_2 下で培養	再懸濁培地：2.0mL

①～⑦の操作は氷上で行ってください。

■ プレートサイズ別試薬量

	封入ステップ			導入ステップ			
	HVJ-E ①	DNA/TE 溶液 ③	試薬 B ④	緩衝液 ⑥	試薬 C ⑦	細胞 ⑧	再懸濁培地 ⑩
6-well	1AU(40μL)	20μL	2μL	30μL	5μL	0.5mL	2.0mL (2.0mL×1well)
24-well	0.5AU(20μL)	10μL	1μL	15μL	2.5μL	0.25mL	1.0mL (0.5mL×2well)
96-well	0.5AU(20μL)	10μL	1μL	15μL	2.5μL	0.25mL	1.0mL (0.125mL×8well)

[26] 34～37℃の恒温槽で速やかに融解し、氷が半分程度解けた時点で直ちに氷上に移してください。
[27] 試薬 B の添加量は、添加前の液量（③）の 1/10 量としてください。
[28] 緩衝液への懸濁は、泡立てないようほぼ均一な白濁状態となるまで行ってください。VORTEX による攪拌は気泡が発生しますので、ご面倒でもピペッティングによる懸濁を推奨いたします。
[29] 細胞の種類により、試薬 C の至適濃度は異なる場合があります。ご使用の細胞に応じて、適宜試薬 C 量の増減検討をお勧めします（2.5～25μL）。その際、最終液量が 35μL となるよう、⑥の緩衝液量を調整してください。
[30] 細胞へのダメージがない範囲で遠心の条件（回転数・温度・時間）を設定してください。

4-1-2：DNA 濃度が低い場合のプロトコル

推奨濃度以下の DNA/TE 溶液しか用意できない場合（0.5～2μg/μL）、試薬 A を用いて HVJ-E への DNA の封入を促進させます。以下は 6-well プレート使用時を例に記載したものです。他のサイズのプレートを使用する場合の細胞数は p3 を参照してください。

■ DNA/TE 溶液濃度：0.5～2μg/μL
■ 細胞数（遠心導入時）：0.4～2.0×10^6 cells/0.5mL of medium/チューブ
■ プロトコル（第 1 法変法）

		手順	試薬量
封入ステップ	①	HVJ-E を融解し、マイクロテストチューブに採取[31]	HVJ-E：1AU（40μL）
	②	試薬 A を添加・混合（タッピング）し、5 分間静置	試薬 A：10μL
	③	DNA/TE 溶液を添加・混合（タッピング）	DNA/TE 溶液：10μL
	④	試薬 B を添加・混合[32]（タッピング）	試薬 B：6μL
	⑤	10000g(10000～12000rpm)・4℃で 5 分間遠心し、上清除去	
導入ステップ	⑥	沈殿を緩衝液に懸濁（ピペッティング 20～30 回）[33]	緩衝液：30μL
	⑦	試薬 C を添加・混合[34]（タッピング）	試薬C：5μL
	⑧	HVJ-E ベクター懸濁液と培地に懸濁した細胞 0.5mL をチューブで混合	懸濁液（⑥+⑦）：35μL 細胞：0.5mL
	⑨	2000～12000rpm、4℃～35℃で 10～30 分間遠心[35]	
	⑩	上清を除去し､培地 2.0mL に再懸濁後 6-well プレートに移し、37℃・5%CO_2 下で培養	再懸濁培地：2.0mL

①～⑦の操作は氷上で行ってください。

■ プレートサイズ別試薬量

	封入ステップ				導入ステップ			
	HVJ-E ①	試薬 A ②	DNA/TE 溶液 ③	試薬 B ④	緩衝液 ⑥	試薬 C ⑦	細胞 ⑧	再懸濁培地 ⑩
6-well	1AU(40μL)	10μL	10μL	6μL	30μL	5μL	0.5mL	2.0mL (2.0mL×1well)
24-well	0.5AU(20μL)	5μL	5μL	3μL	15μL	2.5μL	0.25mL	1.0mL (0.5mL×2well)
96-well	0.5AU(20μL)	5μL	5μL	3μL	15μL	2.5μL	0.25mL	1.0mL (0.125mL×8well)

[31] 34～37℃の恒温槽で速やかに融解し、氷が半分程度解けた時点で直ちに氷上に移してください。
[32] 試薬 B の添加量は、添加前の液量（①+②+③）の 1/10 量としてください。
[33] 緩衝液への懸濁は、泡立てないようほぼ均一な白濁状態となるまで行ってください。VORTEX による攪拌は気泡が発生しますので、ご面倒でもピペッティングによる懸濁を推奨いたします。試薬 A の特性により、遠心後の沈殿が強固になりやすく、緩衝液への懸濁を均一に行うのが難しい場合があります。その場合、さらに 20～30 回ピペッティングを行って十分に懸濁してください。
[34] 細胞の種類により、試薬 C の至適濃度は異なる場合があります。ご使用の細胞に応じて、適宜試薬 C 量の増減検討をお勧めします（2.5～25μL）。その際、最終液量が 35μL となるよう、⑥の緩衝液量を調整してください。
[35] 細胞へのダメージがない範囲で遠心の条件（回転数・温度・時間）を設定してください。

4-2：siRNA の導入

オリゴ型 siRNA は、細胞質で効果を発現し、また、作用の特異性が高いことから低濃度での使用が可能です。また、HVJ-E の使用量もプラスミド DNA の場合の 1/4～1/8 量（0.25 AU～0.125AU）に減らすことが可能です。以下は 6-well プレート使用時を例に記載したものです。他のサイズのプレートを使用する場合の細胞数は p3 を参照してください。

■ オリゴ型 siRNA 溶液濃度：0.1～0.5μg/μL
■ 細胞数（遠心導入時）：0.4～2.0×10^6 cells/0.5mL of medium/チューブ
■ プロトコル（siRNA 用変法）

		手順	試薬量
封入ステップ	①	HVJ-E を融解し、マイクロテストチューブに採取[36]	HVJ-E：0.25AU（10μL）
	②	siRNA 溶液を添加・混合（タッピング）	siRNA 溶液：10μL
	③	試薬 B を添加・混合[37]（タッピング）	試薬 B：2μL
	④	10000g（10000～12000rpm）・4℃で 5 分間遠心し、上清除去	
導入ステップ	⑤	沈殿を緩衝液に懸濁（ピペッティング 20～30 回）[38]	緩衝液：30μL
	⑥	試薬 C を添加・混合[39]（タッピング）	試薬C：5μL
	⑦	HVJ-E ベクター懸濁液と培地に懸濁した細胞 0.5mL をチューブで混合	懸濁液（⑤+⑥）：35μL 細胞：0.5mL
	⑧	2000～12000rpm、4℃～35℃で 10～30 分間遠心[40]	
	⑨	上清を除去し、培地 2.0mL に再懸濁後 6-well プレートに移し、37℃・5%CO_2 下で培養	再懸濁培地：2.0mL

①～⑥の操作は、氷上で行ってください。

■ プレートサイズ別試薬量

	封入ステップ			導入ステップ			
	HVJ-E ①	siRNA 溶液 ②	試薬 B ③	緩衝液 ⑤	試薬 C ⑥	細胞 ⑦	再懸濁培地 ⑨
6-well	0.25AU(10μL)	10μL	2μL	30μL	5μL	0.5mL	2.0mL (2.0mL×1well)
24-well	0.125AU(5μL)	5μL	1μL	15μL	2.5μL	0.25mL	1.0mL (0.5mL×2well)
96-well	0.125AU(5μL)	5μL	1μL	15μL	2.5μL	0.25mL	1.0mL (0.125mL×8well)

●ワンポイントアドバイス

使用する細胞種や標的遺伝子によって HVJ-E の至適量が異なる場合があります。導入効率、ノックダウン効率が低い場合は、ステップ①の HVJ-E 量を 1AU(40μL)～0.125AU(5μL)の範囲で検討し、条件の最適化を行ってください。その際、試薬 B の添加量は、添加前の液量（①+②）の 1/10 量となるよう調整してください。

---

[36] 34～37℃の恒温槽で速やかに融解し、氷が半分程度解けた時点で直ちに氷上に移してください。
[37] 試薬 B の添加量は、添加前の液量（①+②）の 1/10 量としてください。
[38] 緩衝液への懸濁は、泡立てないようほぼ均一な白濁状態となるまで行ってください。VORTEX による攪拌は気泡が発生しますので、ご面倒でもピペッティングによる懸濁を推奨いたします。
[39] 細胞の種類により、試薬 C の至適濃度は異なる場合があります。ご使用の細胞に応じて、適宜試薬 C 量の増減検討をお勧めします（2.5～25μL）。その際、最終液量が 35μL となるよう、⑤の緩衝液量を調整してください。
[40] 細胞へのダメージがない範囲で遠心の条件（回転数・温度・時間）を設定してください。

4-3：アンチセンスオリゴ／デコイオリゴ（ODN）の導入

以下は 6-well プレート使用時を例に記載したものです。他のサイズのプレートを使用する場合の細胞数は p3 を参照してください。

■ ODN 溶液濃度：0.5～2μg/μL
■ 細胞数（遠心導入時）：0.4～2.0×10^6 cells/0.5mL of medium/チューブ
■ プロトコル（第 1 法変法）

		手順	試薬量
封入ステップ	①	HVJ-E を融解し、マイクロテストチューブに採取[41]	HVJ-E：1AU（40μL）
	②	試薬 A を添加・混合（タッピング）し、5 分間静置	試薬 A：10μL
	③	ODN 溶液を添加・混合（タッピング）	ODN 溶液：10μL
	④	試薬 B を添加・混合[42]（タッピング）	試薬 B：6μL
	⑤	10000g(10000～12000rpm)・4℃で 5 分間遠心し、上清除去	
導入ステップ	⑥	沈殿を緩衝液に懸濁（ピペッティング 20～30 回）[43]	緩衝液：30μL
	⑦	試薬 C を添加・混合[44]（タッピング）	試薬C：5μL
	⑧	HVJ-E ベクター懸濁液と培地に懸濁した細胞 0.5mL をチューブで混合	懸濁液（⑥＋⑦）：35μL 細胞：0.5mL
	⑨	2000～12000rpm、4℃～35℃で 10～30 分間遠心[45]	
	⑩	上清を除去し、培地 2.0mL に再懸濁後 6-well プレートに移し、37℃・5%CO_2 下で培養	再懸濁培地：2.0mL

①～⑦の操作は氷上で行ってください。

■ プレートサイズ別試薬量

	封入ステップ				導入ステップ			
	HVJ-E ①	試薬 A ②	ODN 溶液 ③	試薬 B ④	緩衝液 ⑥	試薬 C ⑦	細胞 ⑧	再懸濁培地 ⑩
6-well	1AU（40μL）	10μL	10μL	6μL	30μL	5μL	0.5mL	2.0mL (2.0mL×1well)
24-well	0.5AU(20μL)	5μL	5μL	3μL	15μL	2.5μL	0.25mL	1.0mL (0.5mL×2well)
96-well	0.5AU(20μL)	5μL	5μL	3μL	15μL	2.5μL	0.25mL	1.0mL (0.125mL×8well)

[41] 34～37℃の恒温槽で速やかに融解し、氷が半分程度解けた時点で直ちに氷上に移してください。
[42] 試薬 B の添加量は、添加前の液量（①＋②＋③）の 1/10 量としてください。
[43] 緩衝液への懸濁は、泡立てないようほぼ均一な白濁状態となるまで行ってください。VORTEX による攪拌は気泡が発生しますので、ご面倒でもピペッティングによる懸濁を推奨いたします。試薬 A の特性により、遠心後の沈殿が強固になりやすく、緩衝液への懸濁を均一に行うのが難しい場合があります。その場合、さらに 20～30 回ピペッティングを行って十分に懸濁してください。
[44] 細胞の種類により、試薬 C の至適濃度は異なる場合があります。ご使用の細胞に応じて、適宜試薬 C 量の増減検討をお勧めします（2.5～25μL）。その際、最終液量が 35μL となるよう、⑥の緩衝液量を調整してください。
[45] 細胞へのダメージがない範囲で遠心の条件（回転数・温度・時間）を設定してください。

4-4：タンパク質の導入

以下は 6-well プレート使用時を例に記載したものです。他のサイズのプレートを使用する場合の細胞数は p3 を参照してください。

■ タンパク質溶液濃度：0.5～2μg/μL
■ 細胞数（遠心導入時）：0.4～2.0×10^6 cells/0.5mL of medium/チューブ
■ プロトコル(第 1 法変法)

		手順	試薬量
封入ステップ	①	HVJ-E を融解し、マイクロテストチューブに採取[46]	HVJ-E：1AU（40μL）
	②	試薬 A を添加・混合（タッピング）し、5 分間静置	試薬 A：10μL
	③	タンパク質溶液を添加・混合（タッピング）	タンパク質溶液：10μL
	④	試薬 B を添加・混合[47]（タッピング）	試薬 B：6μL
	⑤	10000g(10000～12000rpm)・4℃で 5 分間遠心し、上清除去	
導入ステップ	⑥	沈殿を緩衝液に懸濁（ピペッティング 20～30 回）[48]	緩衝液：30μL
	⑦	試薬 C を添加・混合[49]（タッピング）	試薬C：5μL
	⑧	HVJ-E ベクター懸濁液と培地に懸濁した細胞 0.5mL をチューブで混合	懸濁液（⑥＋⑦）：35μL 細胞：0.5mL
	⑨	2000～12000rpm、4℃～35℃で 10～30 分間遠心[50]	
	⑩	上清を除去し、培地 2.0mL に再懸濁後 6-well プレートに移し、37℃・5%CO_2 下で培養	再懸濁培地：2.0mL

①～⑦の操作は氷上で行ってください。

■ プレートサイズ別試薬量

	封入ステップ				導入ステップ			
	HVJ-E ①	試薬 A ②	タンパク質溶液 ③	試薬 B ④	緩衝液 ⑥	試薬 C ⑦	細胞 ⑧	再懸濁培地 ⑩
6-well	1AU(40μL)	10μL	10μL	6μL	30μL	5μL	0.5mL	2.0mL (2.0mL×1well)
24-well	0.5AU(20μL)	5μL	5μL	3μL	15μL	2.5μL	0.25mL	1.0mL (0.5mL×2well)
96-well	0.5AU(20μL)	5μL	5μL	3μL	15μL	2.5μL	0.25mL	1.0mL (0.125mL×8well)

●ワンポイントアドバイス
陽性電荷のタンパク質の場合、封入ステップ②の試薬 A の添加量を減らす（1/2～1/8）か、試薬 A を添加しない方法でお試しください。その場合、④の試薬 B の添加量は添加前の液量（①＋②＋③）の 1/10 量となるよう調整してください。

[46] 34～37℃の恒温槽で速やかに融解し、氷が半分程度解けた時点で直ちに氷上に移してください。
[47] 試薬 B の添加量は、添加前の液量（①＋②＋③）の 1/10 量としてください。
[48] 緩衝液への懸濁は、泡立てないようほぼ均一な白濁状態となるまで行ってください。VORTEX による攪拌は気泡が発生しますので、ご面倒でもピペッティングによる懸濁を推奨いたします。試薬 A の特性により、遠心後の沈殿が強固になりやすく、緩衝液への懸濁を均一に行うのが難しい場合があります。その場合、さらに 20～30 回ピペッティングを行って十分に懸濁してください。
[49] 細胞の種類により、試薬 C の至適濃度は異なる場合があります。ご使用の細胞に応じて、適宜試薬 C 量の増減検討をお勧めします（2.5～25μL）。その際、最終液量が 35μL となるよう、⑥の緩衝液量を調整してください。
[50] 細胞へのダメージがない範囲で遠心の条件（回転数・温度・時間）を設定してください。

4-5：トラブルシューティング

■ 導入効率が低い

以下の処理で効率を高めることが可能な場合があります。

- 試薬 C の添加量を標準の 2～4 倍にする。
- トランスフェクション時の培地量を減らし、HVJ-E ベクターおよび試薬 C の処理濃度を高める。
- HVJ-E ベクターを細胞に添加後の遠心時間を 60 分程度まで延長する。

■ 細胞毒性が高い

細胞毒性が認められる場合は、以下の対応で毒性を軽減させることが可能な場合があります。

- HVJ-E ベクターを細胞に添加後の遠心時間を最短の 10 分間とする。また、その時の温度を 4℃とする。
- HVJ-E の使用量または HVJ-E ベクターの培地への添加量を減らす。
- 試薬 C の添加量を減らす(または処理しない)。

5．動物個体へのトランスフェクション（*in vivo*）

動物個体への適用の一例として、ここではマウスの臓器、組織、血管内に投与する場合の例を記載しています。対象となる動物の種類や標的臓器・部位などにより、投与方法や投与量などの条件は多岐に考えられますので個別の事例についてはご検討いただくか、弊社担当までご相談ください。

5-1：プラスミド DNA、siRNA の導入

■ DNA/TE 溶液濃度：1μg/μL
　オリゴ型 siRNA 溶液濃度：1μg/μL
■ プロトコル（in vivo M 法）
※第 2 法(p4)に準じた封入法も適用可能ですが、新たに開発された本法の方が操作がより簡便です。

		手順	試薬量
封入ステップ	①	HVJ-E を融解し[51]、マイクロテストチューブに採取	HVJ-E：1AU（40μL）
	②	試薬 B を添加・混合（タッピング）[52]	試薬 B：4μL
	③	10000g（10000～12000rpm）・4℃で 10 分間遠心し、上清除去	
	④	沈殿を緩衝液等に懸濁（ピペッティング 20～30 回）[53]	緩衝液または 生理食塩水等：10μL
	⑤	DNA/TE 溶液または siRNA 溶液を添加・混合 （タッピング）	DNA/TE 溶液または siRNA 溶液：10μL
	⑥	5 分間静置	
導入ステップ	⑦	HVJ-E ベクター懸濁液を動物に投与（必要に応じて生理食塩水などで希釈）	投与量：目的に応じて調整
	⑧	一定時間後に解析（標本作製・顕微鏡観察など）	

①～⑥の操作は氷上で行ってください。

●ワンポイントアドバイス
- HVJ-E の使用量は、マウスの場合 1～2AU、ラットでは 5～10AU を目安にお考えください。HVJ-E の使用量に応じて、以降の各種試薬量も比例計算して調整してください。
- 投与量は、投与対象部位、投与ルート等の実験系に応じ、HVJ-E ベクター懸濁液⑥に適宜緩衝液または生理食塩水等を加えて調整してください。
- 動物への投与では、基本的に試薬 C を処理しないことを推奨いたします。導入物質を投与部位近傍の組織に留めたい場合には、HVJ-E ベクター懸濁液⑥に試薬 C を添加することで調整を行うことも可能です。
- HVJ-E は生体内、特に血液中で血球細胞への吸着が起こる可能性がありますので、できるだけ血液との接触が少ない投与ルートを選択するか、投与前に灌流処理することを推奨いたします。

[51] 34～37℃の恒温槽で速やかに融解し、氷が半分程度解けた時点で直ちに氷上に移してください。
[52] 試薬 B の添加量は、原則として添加前の液量（①）の 1/10 量としてください。
[53] 緩衝液への懸濁は、泡立てないようほぼ均一な白濁状態となるまで行ってください。VORTEX による攪拌は気泡が発生しますので、ご面倒でもピペッティングによる懸濁を推奨いたします。

5-2：アンチセンスオリゴ／デコイオリゴ（ODN）、タンパク質の導入

■ ODN 溶液濃度：0.5～2μg/μL
タンパク質溶液濃度：0.5～2μg/μL
■ プロトコル（in vivo 第 1 法）

		手順	試薬量
封入ステップ	①	HVJ-E を融解し[54]、マイクロテストチューブに採取	HVJ-E：1AU（40μL）
	②	試薬 A を添加・混合（タッピング）し、5 分間静置	試薬 A：10μL
	③	ODN またはタンパク質溶液を添加・混合（タッピング）	ODN または タンパク質溶液：10μL
	④	試薬 B を添加・混合（タッピング）[55]	試薬 B：6μL
	⑤	10000g（10000～12000rpm）・4℃で 5 分間遠心し、上清除去	
導入ステップ	⑥	沈殿を緩衝液等に懸濁（ピペッティング 20～30 回）[56]	緩衝液または生理食塩水等： 実験系に合わせて選択
	⑦	HVJ-E ベクター懸濁液を動物に投与（必要に応じて生理食塩水などで希釈）	投与量：目的に応じて調整
	⑧	一定時間後に解析（標本作製・顕微鏡観察など）	

①～⑥の操作は氷上で行ってください。

●ワンポイントアドバイス
- HVJ-E の使用量は、マウスの場合 1～2AU、ラットでは 5～10AU を目安にお考えください。HVJ-E の使用量に応じて、以降の各種試薬量も比例計算して調整してください。
- 投与量は、投与対象部位、投与ルート等の実験系に応じ、HVJ-E ベクター懸濁液⑥に適宜緩衝液または生理食塩水等を加えて調整してください。
- 動物への投与では、基本的に試薬 C を処理しないことを推奨いたします。導入物質を投与部位近傍の組織に留めたい場合には、HVJ-E ベクター懸濁液⑥に試薬 C を添加することで調整を行うことも可能です。
- HVJ-E は生体内、特に血液中で血球細胞への吸着が起こる可能性がありますので、できるだけ血液との接触が少ない投与ルートを選択するか、投与前に灌流処理することを推奨いたします。
- ③の溶液が異常に白濁したり不均一な沈殿が生じる場合は、封入する ODN／タンパク質の精製度を上げていただくか、試薬 A の添加量（②）を減量（1/2～1/8）する、または試薬 A を添加しない方法でお試しください。その場合、④の試薬 B の添加量が添加前の液量（①＋②＋③）の 1/10 量となるよう調整してください。
- 陽性電荷のタンパク質の場合、封入ステップ②の試薬 A の添加量を減らす（1/2～1/8）か、試薬 A を添加しない方法でお試しください。その場合、④の試薬 B の添加量は添加前の液量（①＋②＋③）の 1/10 量となるよう調整してください。

[54] 34～37℃の恒温槽で速やかに融解し、氷が半分程度解けた時点で直ちに氷上に移してください。
[55] 試薬 B の添加量は、原則として添加前の液量（①+②+③）の 1/10 量としてください。
[56] 緩衝液への懸濁は、泡立てないようほぼ均一な白濁状態となるまで行ってください。VORTEX による攪拌は気泡が発生しますので、ご面倒でもピペッティングによる懸濁を推奨いたします。試薬 A の特性により、遠心後の沈殿が強固になりやすく、緩衝液への懸濁を均一に行うのが難しい場合があります。その場合、さらに 20～30 回ピペッティングを行って十分に懸濁してください。

6．多種類・多検体の迅速なトランスフェクション

コンテンツを封入する前の HVJ-E に試薬 B を処理し、予めコンピテント状態の HVJ-E を調製しますので、多種類のコンテンツを短時間に封入することが可能です。例えば、96-well プレートを使用した場合、96 種類の異なるコンテンツのトランスフェクションが約 30 分の操作で完了します。従って、複数の遺伝子、siRNA などを同一プレートに迅速処理し、細胞の機能解析や新規遺伝子の探索を行いたい場合などのハイスループット的な使用目的に本法が適しています。

他のサイズのプレートを使用する場合でも、well の面積比で処理用量を調整することでトランスフェクションが可能です。

6-1：プラスミド DNA の導入

■ DNA/TE 溶液濃度：0.1～0.25μg/μL
■ 細胞数：0.2～1.0×10^4 cells/0.1mL of medium/well of 96-well plate
■ プロトコル（M 法）

以下は 96-well プレート使用時を例に記載したものです。
※本法は、接着細胞への適用を想定したものです。

		手順（96-well プレート対応）	試薬量
封入ステップ	①	HVJ-E を融解し[57]、マイクロテストチューブに採取	HVJ-E：6.25AU（250μL）
	②	試薬 B を添加・混合[58]（タッピング）	試薬 B：25μL
	③	10000g（10000～12000rpm）・4℃で 10 分間遠心し、上清除去[59]	
	④	沈殿を緩衝液に懸濁（ピペッティング 20～30 回）[60]	緩衝液：500μL
	⑤	④をベクター調製用 96-well プレート[61]に分注	5μL/well
	⑥	各 well に DNA/TE 溶液を添加・混合（plate shaker 等を使用）	5μL/well
	⑦	5 分間静置	
導入ステップ	⑧	16 倍希釈した試薬 C（試薬 C 35μL+緩衝液 525μL）を添加・混合（plate shaker 等を使用）	希釈した試薬 C：5μL/well
	⑨	培地を各 well に添加・混合（plate shaker 等を使用）	培地：50μL/well
	⑩	予め細胞を培養しておいた別の 96-well プレートの各 well に、HVJ-E ベクター懸濁液を添加し、37℃・5%CO_2 下で細胞に処理（必要に応じて培地交換）[62]	懸濁液（⑤+⑥+⑧+⑨）：65μL/well
	⑪	37℃・5%CO_2 下で培養	

①～④の操作は、氷上で行ってください。

[57] 34～37℃の恒温槽で速やかに融解し、氷が半分程度解けた時点で直ちに氷上に移してください。
[58] 試薬 B の添加量は、添加前の液量（①）の 1/10 量としてください。
[59] 本法では、遠心後の HVJ-E のペレットが崩れやすいため、上清を除去する際に誤って吸い取らないようにご注意ください。
[60] 緩衝液への懸濁は、泡立てないようほぼ均一な白濁状態となるまで行ってください。VORTEX による攪拌は気泡が発生しますので、ご面倒でもピペッティングによる懸濁を推奨いたします。
[61] HVJ-E への封入処理用として、トランスフェクション対象の細胞培養プレートとは別のプレートをご用意ください。
[62] 通常は HVJ-E ベクター懸濁液（⑤+⑥+⑧+⑨）を添加したままで除去する必要はありませんが、細胞毒性が見られる場合は、処理時間を 10 分間～3 時間程度として培地交換してください。

6-2：siRNA の導入

■ オリゴ型 siRNA 溶液濃度：0.01～0.05μg/μL
■ 細胞数：0.2～1.0×10^4 cells/0.1mL of medium/well of 96-well plate
■ プロトコル（siRNA 用 M 法）
以下は 96-well プレート使用時を例に記載したものです。
※本法は、接着細胞への適用を想定したものです。

		手順（96-well プレート対応）	試薬量
封入ステップ	①	HVJ-E を融解し[63]、マイクロテストチューブに採取	HVJ-E：1.75AU（70μL）
	②	試薬 B を添加・混合[64]（タッピング）	試薬 B：7μL
	③	10000g（10000～12000rpm）・4℃で 5 分間遠心し、上清除去[65]	
	④	沈殿を緩衝液に懸濁（ピペッティング 20～30 回）[66]	緩衝液：560μL
	⑤	④をベクター調製用 96-well プレート[67]に分注	5μL/well
	⑥	各 well に siRNA 溶液を添加・混合（plate shaker 等を使用）	5μL/well
	⑦	5 分間静置	
導入ステップ	⑧	16 倍希釈した試薬 C（試薬 C 35μL+緩衝液 525μL）を添加・混合（plate shaker 等を使用）	希釈した試薬 C：5μL/well
	⑨	培地を各 well に添加・混合（plate shaker 等を使用）	培地：50μL/well
	⑩	予め細胞を培養しておいた別の 96-well プレートの各 well に、HVJ-E ベクター懸濁液を添加し、37℃・5%CO_2 下で細胞に処理（必要に応じて培地交換）[68]	懸濁液（⑤+⑥+⑧+⑨）：65μL/well
	⑪	37℃・5%CO_2 下で培養	

①～④の操作は、氷上で行ってください。

[63] 34～37℃の恒温槽で速やかに融解し、氷が半分程度解けた時点で直ちに氷上に移してください。
[64] 試薬 B の添加量は、添加前の液量（①）の 1/10 量としてください。
[65] 本法では、遠心後の HVJ-E のペレットが崩れやすいため、上清を除去する際に誤って吸い取らないようにご注意ください。
[66] 緩衝液への懸濁は、泡立てないようほぼ均一な白濁状態となるまで行ってください。VORTEX による攪拌は気泡が発生しますので、ご面倒でもピペッティングによる懸濁を推奨いたします。
[67] HVJ-E への封入処理用として、トランスフェクション対象の細胞培養プレートとは別のプレートをご用意ください。
[68] 通常は HVJ-E ベクター懸濁液（⑤+⑥+⑧+⑨）を添加したままで除去する必要はありませんが、細胞毒性が見られる場合は、処理時間を 10 分間～3 時間程度として培地交換してください。

使用上の注意

1. 本製品は、研究目的にのみご使用ください。ヒト・動物への医療・臨床目的および生体内外診断の目的には使用できません。

2. 本製品は「遺伝子組換え生物等の使用等の規制による生物の多様性の確保に関する法律（カルタヘナ議定書担保法）」の規制を受けずにご使用いただけますが、組換え DNA 実験の実施に際しては、当該法律および各研究機関内の安全性委員会の定める「組換え DNA 実験指針」を遵守し、実験目的に応じた適切な設備を有する実験室をご使用ください。

3. 本製品を用いた実験は、細胞培養および遺伝子工学に関する基本的な知識と手技を習得した実験者により実施してください。

4. 本キットに含まれる HVJ Envelope は、HVJ（センダイウイルス）を不活性化しており増殖性･感染性を完全になくしてありますが、膜の融合活性は保持していますので、万一の人体への吸入や付着を防ぐため安全キャビネット内で操作し、実験者は手袋、マスク等の防護具をご使用ください。

5. 実験後の空容器の廃棄に際しても取扱に注意し、適切に処置してください。

6. キット付属の他の試薬類については、毒物や劇物に属するものではありませんが、取扱に際しては手袋・マスク等の防護具をご使用ください。

7. HVJ Envelope 懸濁液は、無菌試験でバクテリア、カビ類の混入がないことを確認していますが、全ての微生物の存在を否定するものではありませんので、ご使用に際してはご注意ください。

8. 本製品の使用によって生じた如何なる事故、損害に対しても、弊社では責任を負いかねますので、予めご了承の上ご使用ください。

9. 弊社の文書による事前許諾なしに本製品の商業目的でのご使用、製品の改変等による再販売はできません。

ISK 石原産業株式会社
〒550-0002　大阪市西区江戸堀 1 丁目 3 番 15 号

【お問い合わせ先】
フリーダイヤル 0120-409-816
Tel：06-6444-7182　FAX：06-6444-7183
E-Mail：HVJ-E@iskweb.co.jp
URL：http://www.iskweb.co.jp/hvj-e